

مقاله پژوهشی

سنتز و شناسایی نانوکامپوزیت گرافن-نانوذرات ZnO و کاربرد آن برای فعالیت‌های ضد باکتری

سولماز عبداللهی^۱، افشین پوراحمد^{۱*}، لیلا اسدپور^۲

۱- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۲/۲۳

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۵/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: بررسی اثر ضد باکتری نانومواد به دلیل افزایش مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها اهمیت پیدا کرده است. مواد ضد باکتری معدنی نسبت به مواد آلی که معمولاً استفاده می‌شوند دارای مزایای متعددی مانند پایداری شیمیایی، مقاومت حرارتی، ایمنی برای کاربر و فعالیت طولانی‌مدت دوره هستند. در این تحقیق، خواص ضد باکتری نانوکامپوزیت گرافن - نانوذرات اکسید روی برای باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) و گرم منفی (*اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا*) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر، طراحی همگن نانوذرات اکسید روی بر سطح گرافن با روش شیمیایی ساده را نشان می‌دهد. فعالیت ضد باکتری نانوذرات ZnO به روش تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و انتشار از دیسک، در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج XRD، پیک‌های پراش برای هر دو ترکیب را در نانوکامپوزیت نشان می‌دهد. مطالعات D نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید روی سنتز شده دارای ساختار ورتزیت هگزاگونالی است و نشان داد که اکسید گرافن باعث کاهش اندازه ذرات می‌شود. میانگین اندازه نانوذرات اکسید روی با میکروسکوپ الکترونی عبوری حدود ۲۰ nm تخمین زده شد. نانوذرات اکسید روی اثرات ضد باکتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را نشان دادند. افزایش سطح در نانوذرات اکسید روی نسبت به میکروذرات موجب بهبود فعالیت ضد باکتری شده است. **نتیجه‌گیری:** نانوکامپوزیت جدید دارای فعالیت ضد باکتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus*) و باکتری‌های گرم منفی (*E. Coli*) و (*Pseudomonas aeruginosa*) است.

کلمات کلیدی: اکسید گرافن، نانوذرات ZnO، نانوکامپوزیت، فعالیت ضد باکتریال

مقدمه

آنتی‌بیوتیک بوده و تبدیل به یک بیماری جدی برای سلامتی انسان می‌شوند. در دهه‌های گذشته دانشمندان در سراسر جهان به دنبال عوامل ضد میکروبی جدید باقابلیت افزایش یافته بوده‌اند (۱ و ۲). برای پاسخگویی به تقاضای روزافزون برای تهیه عوامل ضد باکتری کارا تر، چندین نانومواد تولید شده است. باین‌حال، بسیاری از نانومواد ضد میکروبی که تاکنون گزارش شده‌اند با نگرانی در مورد مسمومیت، آلودگی محیط‌زیست، ناسازگاری بیولوژیکی و روش سنتز پیچیده همراه هستند (۳). در نتیجه همچنان یک چالش برای تولید نانومواد ضد باکتری کارآمد، جدید و دوستدار محیط‌زیست وجود دارد. اکسید روی یک

نانوتکنولوژی محدوده‌ای از تکنولوژی است که در این محدوده انسان می‌تواند انواع ترکیبات، آلیاژها، وسایل و ابزارها و به‌طور کلی، سیستم‌ها و سازه‌های گوناگون را در مقیاس اتمی و مولکولی و ابعاد نانومتری (یک میلیارد متر) طراحی کرده و به مرحله ساخت برساند. آنتی‌بیوتیک‌ها در مراقبت‌های بهداشتی به‌طور گسترده‌ای مورداستفاده قرار می‌گیرند که به‌موجب آن پاتوژن‌ها در حال تبدیل‌شدن به میکروب‌های مقاوم به

*نویسنده مسئول: افشین پوراحمد، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
Email: pourahmad@iaurasht.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-2007-89919

۱۷ اسیدسولفوریک و ۹ ml اسید نیتریک دود کننده درون یک بالن ته صاف ریخته و در حمام آب یخ گذاشته تا خوب مخلوط گردد. ۱۱ گرم پتاسیم کلرات را به تدریج در طی ۱۵ دقیقه به مخلوط اضافه کرده و اجازه داده شد تا محلول حاصل در دمای اتاق به مدت ۹۶ ساعت هم زده شود. سپس مقداری آب تقطیر شده را به محتویات بالن اضافه کرده و سوسپانسیون حاصل صاف گردید. در مرحله‌ی بعد ماده صاف شده با ۱۰۰۰ ml هیدروکلریک اسید ۵٪، متانول، دی اتیل اتر به ترتیب شستشو داده تا pH محلول زیر صافی به حالت خنثی برسد. پس از خشک شدن ماده صاف شده (اکسید گرافیت) مقداری از آن به مدت یک ساعت در حمام التراسونیک با قدرت ۲۴۰ وات قرار داده شد تا اکسید گرافن به دست آمد.

سنتز نانوکامپوزت گرافن - نانوذرات اکسید روی

۲۱/۹۴۹ گرم استات روی را به همراه آب مقطر درون یک بشر ۱۵۰ میلی لیتری ریخته و توسط همزن شیشه‌ای هم زده تا استات روی کاملاً در آب مقطر حل گردید. در ادامه، ۰/۰۲۵ گرم اکسید گرافن و ۱۰۰ ml آب مقطر در بالن ۲۵۰ ml ریخته و برای نیم ساعت تحت التراسونیک قرار داده شد. سپس استات روی به آن اضافه شد و به مدت ۵ ساعت رفلکس گردید. در مرحله بعد ماده به وسیله سانتریفوژ صاف شده و چند بار با آب مقطر شستشو داده شد. سپس بعد از خشک شدن ماده صاف شده سه ساعت در خلأ^۳ ۱۰- مگاپاسکال در دمای ۲۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و به این روش نانوکامپوزیت گرافن- اکسید روی تهیه گردید.

تعیین حساسیت میکروبی به روش انتشار از دیسک

تهیه محیط کشت آگار مولر هینتون

۳۴ گرم از پودر محیط کشت آگار مولر هینتون در یک لیتر آب مقطر حل و با حرارت دادن شفاف گردید. سپس محیط در اتوکلاو استریل شد و در زیر هود میکروبیولوژی در پلیت‌های استریل ریخته شد و ۲۰-۱۵ دقیقه زمان داده شد تا محیط به حالت جامد تبدیل گردد.

تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند

به منظور تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند ۰/۵ میلی لیتر کلرید باریم (BaCl₂) ۰/۱٪ مولار به همراه ۹۹/۵ میلی لیتر از اسیدسولفوریک ۱٪ تهیه شد. سپس در لوله آزمایش، ۱۰ میلی لیتر از اسیدی را که تهیه شده بود ریخته و ۵۰ میکرولیتر از آن خارج و ۵۰ میکرولیتر از کلرید باریم به آن اضافه شد. جذب

اکسید نیمه‌هادی بلوری با شکاف انرژی مستقیم برابر ۳/۳۷ eV است. ساختار بلوری مهم ZnO نوع ورتزیت آن است ولی به شکل ساختار بلاند روی هم وجود دارد. اکسید روی به دلیل خواص ویژه و دارا بودن شکاف انرژی بالا یکی از اصلی‌ترین نانوذره‌های فلزی است که کاربردهای متنوعی در صنعت و محیط زیست دارد. ایمنی ZnO و سازگاری آن با پوست انسان آن را به یک افزودنی مناسب برای منسوجات و سطوحی که در تماس با بدن انسان است تبدیل کرده است (۴). نانوذرات ZnO اثرات ضد میکروبی روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین اسپورهایی که مقاوم به درجه حرارت بالا و پایین هستند از خود نشان می‌دهد (۵). فعالیت‌های ضد میکروبی نانوذرات ZnO نسبت به میکروذرات به دلیل افزایش سطح نانوذرات بهبود یافته است و هرچه اندازه ذرات کوچک‌تر باشد خاصیت ضد میکروبی افزایش می‌یابد (۶). به طور کلی، ZnO توانایی باکتری را کاهش می‌دهد؛ باین حال تاکنون مکانیسم فعالیت ضد میکروبی آن به خوبی شناخته نشده است. پیشنهاد شده است عامل اصلی فعالیت‌های ضد میکروبی می‌تواند تولید پراکسید هیدروژن باشد. همچنین تجمع ذرات روی سطح باکتری به دلیل نیروی الکترواستاتیکی می‌تواند مکانیسم دیگر اثر ضد میکروبی نانوذره ZnO باشد (۷). باین حال گونه‌های واکنشگر اکسیژن تولید شده روی سطح ذرات، انتشار یون روی، اختلال در غشا و فرآیندهای غشایی و همچنین نانوذرات درونی می‌توانند از دلایل احتمالی آسیب سلولی باشد (۸). گرافن ورقه‌ای دوبعدی از اتم‌های کربن در یک پیکربندی شش ضلعی است که اتم‌ها با هیبرید sp² به هم متصل شده‌اند. در یک صفحه گرافن، هر اتم کربن با ۳ اتم کربن دیگر پیوند داده است و این سه پیوند در یک صفحه قرار دارند و زوایای بین آن‌ها با یکدیگر مساوی و برابر با ۱۲۰° است. گرافن به دلیل ساختار خود، در زمینه‌های زیادی ویژگی‌های بسیار منحصر به فردی را نشان می‌دهد. در این تحقیق اکسید روی در ماتریس گرافن سنتز گردید. نانوکامپوزیت گرافن - نانوذرات اکسید روی پس از سنتز و شناسایی برای بررسی اثر ضد میکروبی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سنتز اکسید گرافن

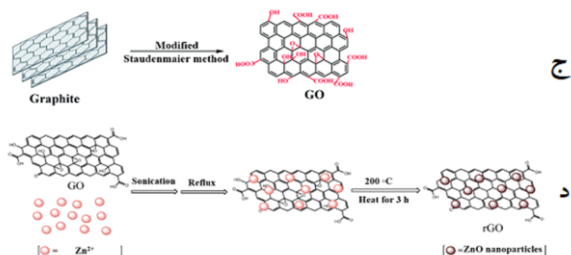
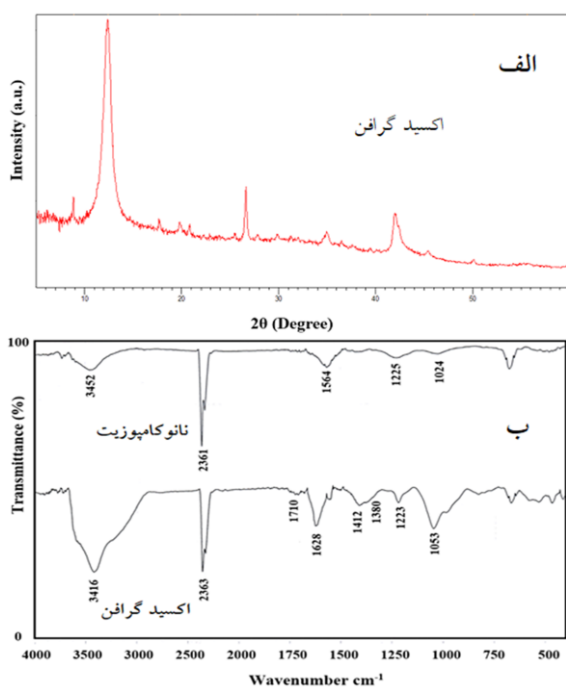
اکسید گرافن از پودر گرافیت خالص از طریق روش Staudenmaier تهیه گردید. ۱ گرم پودر گرافیت را به همراه ml

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. در نهایت قطر هاله‌های عدم رشد باکتری در اطراف هر دیسک اندازه‌گیری شد و کم‌ترین غلظت اکسید گرافن و نانوکامپوزیت که منجر به تشکیل هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک گردید به عنوان کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد باکتری (MIC) در نظر گرفته شد.

نتایج

شناسایی اکسید گرافن و نانوکامپوزیت گرافن-نانوذرات اکسید روی

الگوی پراش اشعه ایکس اکسید گرافن، طیف FTIR اکسید گرافن و نانوکامپوزیت، شماتیک تبدیل گرافیت به اکسید گرافن و سنتز نانوذرات ZnO و تبدیل اکسید گرافن به گرافن در شکل ۱ ارائه گردیده است.



شکل ۱- الگوی پراش اشعه ایکس اکسید گرافن (الف)، طیف FTIR اکسید گرافن و نانوکامپوزیت (ب)، شماتیک تبدیل گرافیت به اکسید گرافن (ج) و سنتز نانوذرات ZnO و تبدیل اکسید گرافن به گرافن (د)

نوری محلول تهیه شده در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. سپس در لوله خشک و تمیز ریخته در لوله کاملاً مسدود گردید نهایتاً در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

ابتدا در دو لوله آزمایش، هر کدام ۴ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ریخته و استریل گردید. سپس کلنی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه‌های بالینی در لوله‌های جداگانه تلقیح شد تا کدورتی مشابه ۰/۵ مک‌فارلند داشته باشند.

تلقیح سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت

پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، یک سوآپ استریل آغشته به سوسپانسیون میکروبی گردید و پس از گرفتن مایع اضافی آن توسط فشار دادن سوآپ به دیواره داخلی لوله، سوآپ مرطوب در سطح محیط مولر هینتون آگاری که قبلاً به دمای اتاق رسیده بود به‌طور یکنواخت کشت پر داده شد.

قرار دادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی

۱۵ دقیقه قبل از شروع این مرحله از آزمایش دیسک‌های آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین، ونکومايسين، آموکسی‌سیلین، اریترومايسين، استرپتومايسين، تتراسیکلین، سفکسیم از یخچال خارج گردید تا دمای آن‌ها به دمای اتاق برسد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک توسط پنس استریل و سرد شده، برداشته و در سطح پلیت قرار داده شدند. با پنس دیسک مختصری فشار داده شد تا کاملاً با سطح محیط کشت تماس یابد. دیسک‌ها با فاصله ۲۰ میلی‌متر از لبه پلیت و ۲۰ میلی‌متر از دیسک‌های دیگر قرار داده شد سپس کشت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد اندازه گرفته شد.

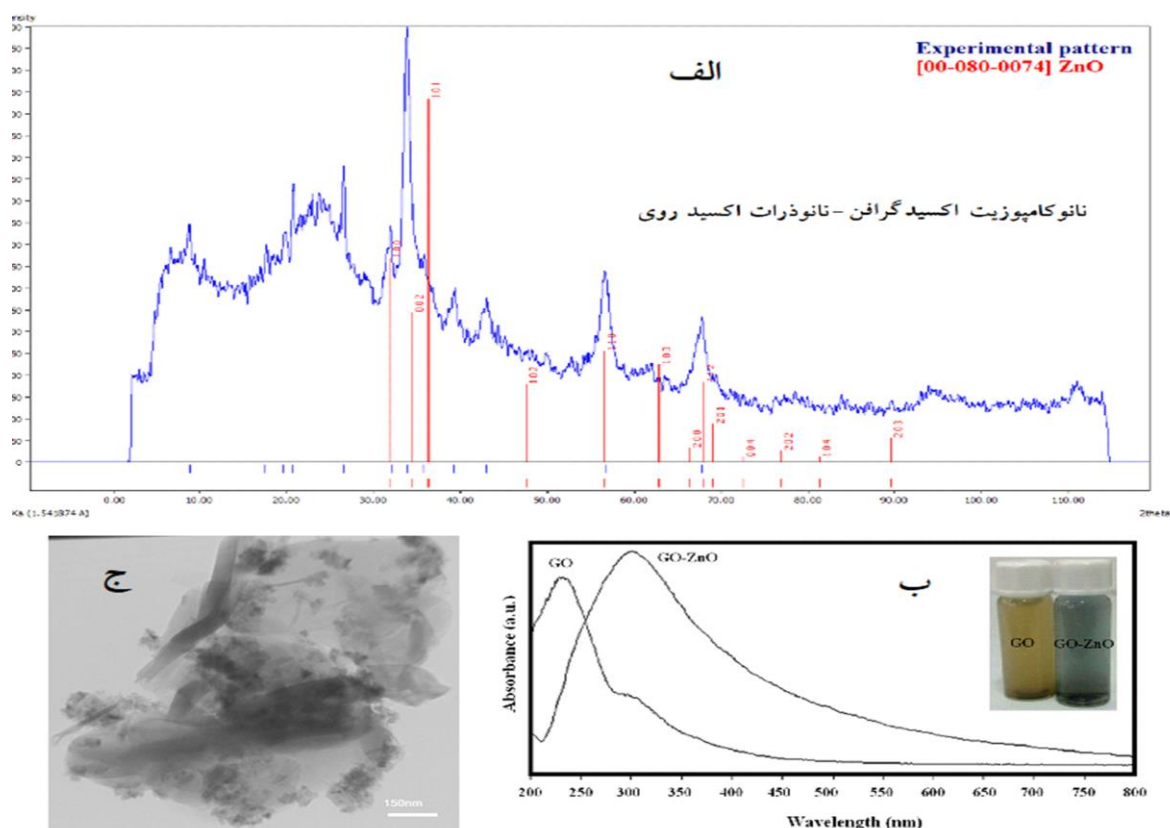
تعیین اثر ضد میکروبی اکسید گرافن و نانوکامپوزیت

گرافن-نانوذرات اکسید روی

پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، یک سوآپ استریل آغشته به سوسپانسیون میکروبی گردید. پس از گرفتن مایع اضافی آن، سوآپ مرطوب در سطح محیط مولر هینتون آگاری که قبلاً به دمای اتاق رسیده بود پخش گردید. دیسک‌های تهیه شده حاوی غلظت‌های مختلف اکسید گرافن و نانوکامپوزیت بر روی این کشت میکروبی گذاشته شدند. سپس پلیت‌ها در انکوباتور با

طیف EDX نانولایه‌های اکسید گرافن و نانوکامپوزیت همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی اکسید گرافن و نانوکامپوزیت در شکل ۳ مشاهده می‌گردد.

الگوی پراش اشعه ایکس ترکیب نانوکامپوزیت، طیف جذبی - فرابنفش اکسید گرافن و نانوکامپوزیت و همچنین تصویر TEM نانوکامپوزیت در شکل ۲ ارائه شده است.



شکل ۲- الگوی XRD نانوکامپوزیت (الف)، طیف UV-vis اکسید گرافن و نانوکامپوزیت (ب) و تصویر TEM نانوکامپوزیت

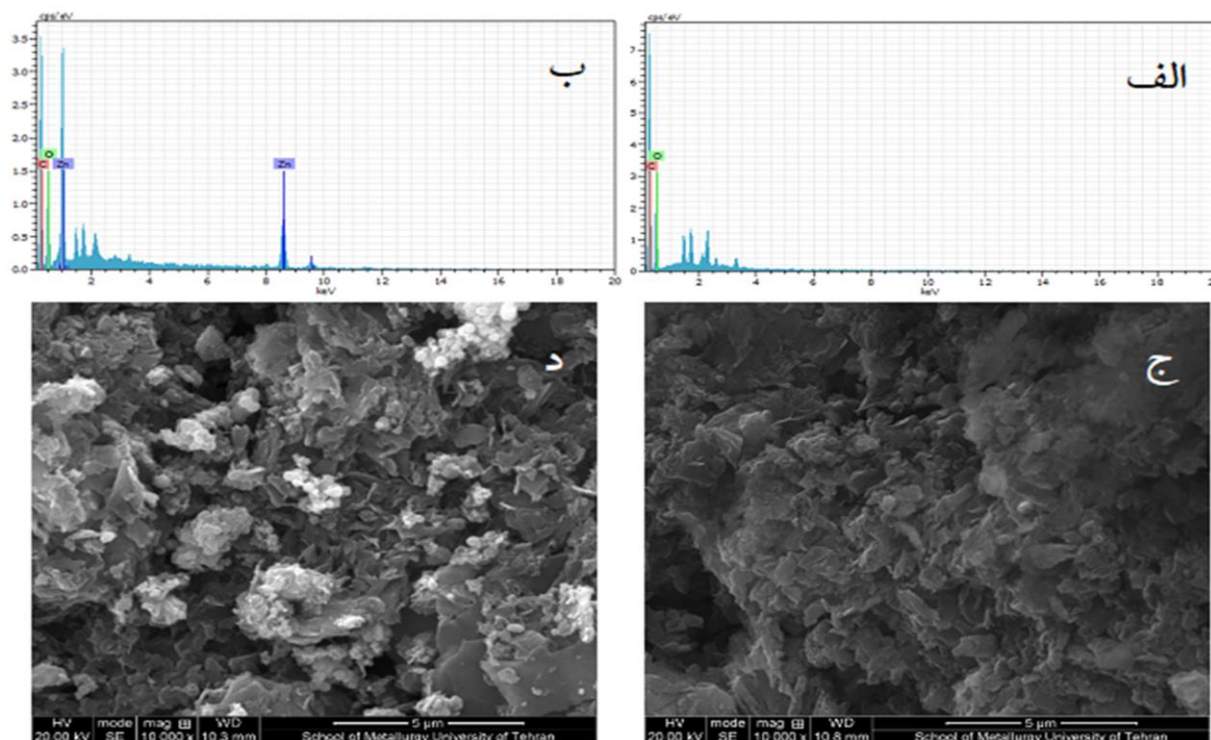
جدول ۱- مقایسه اثر ضد میکروبی ZnO، GO و نانوکامپوزیت در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد

قطر هاله عدم رشد (mm)			
ماده ضد میکروبی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشرشیاکلی	سودوموناس انروژینوزا
ونکومايسين	۱۲	-	-
متی سیلین	۰	-	-
آموکسی سیلین	۰	۰	۰
اریترومایسین	۱۶	۱۴	۱۲
سفکسیم	۱۴	۱۵	۱۶
تتراسیکلین	۰	۰	۰
ZnO (۸۰ µg)	۶	۷	۵
GO (۸۰ µg)	۰	۰	۰
نانوکامپوزیت (۴۵ µg)	۹	۱۱	۹

بررسی اثر ضد میکروبی GO, ZnO و نانوکامپوزیت

اثر ضد باکتری نانوکامپوزیت بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* در شکل ۴ ارائه گردیده است.

اکسایش بر روی ترکیب گرافیت در این الگوی پراش پیک تیز مربوط به گرافیت در $2\theta = 26/3^\circ$ بسیار ضعیف است که نشان می‌دهد ترکیب گرافیت به‌خوبی به اکسید گرافن (GO) تبدیل شده است. پیک تیز و با شدت بسیار بالا در ناحیه $2\theta = 12/4^\circ$



شکل ۳- طیف EDX نانولایه‌های اکسید گرافن (الف)، طیف EDX نانوکامپوزیت (ب)، تصاویر SEM اکسید گرافن (ج) و نانوکامپوزیت (د)



شکل ۴- اثر ضد باکتری نانوکامپوزیت بر روی (الف) *استافیلوکوکوس اورئوس*، (ب) *اشرشیاکلی*، (ج) *سودوموناس آئروژینوزا*

و پیک ضعیف در $2\theta = 41/9^\circ$ به ترتیب مربوط به صفحات (۰۰۲) و (۱۰۰) ترکیب اکسید گرافن در شکل ۱ (الف) ملاحظه می‌گردد (۹). انتقال پیک از $2\theta = 26/3^\circ$ در ترکیب گرافیت به پیکی در $2\theta = 12/4^\circ$ در ترکیب اکسید گرافن به علت حضور گروه‌های عاملی در لایه‌های گرافیت است که موجب می‌شود فاصله بین لایه‌ها افزایش پیدا کند. فاصله بین لایه‌های ترکیب

برای مقایسه قطر هاله عدم رشد ایجادشده توسط برخی دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک به همراه اکسید روی، اکسید گرافن و نانوکامپوزیت در جدول ۱ مشاهده می‌گردد.

بحث

همان‌طور که در الگوی پراش اشعه ایکس ترکیب اکسید گرافن (GO) در شکل ۱ (الف) مشاهده می‌گردد پس از انجام فرایند

می‌دهد که ساختار اصلی ترکیب کربنی حفظ شده است و فقط ترکیب اکسید گرافن به گرافن کاهش یافته است (۱۲). تغییرات به وجود آمده در اکسید گرافن در هنگام سنتز نانوذرات اکسید روی را می‌توان در شکل ۱ (ج و د) مشاهده نمود.

الگوی پراش اشعه ایکس ترکیب نانوکامپوزیت در شکل ۲ (الف) ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد پیک تیز و با شدت بسیار بالا ترکیب اکسید گرافن در ناحیه $2\theta = 12/40^\circ$ مربوط به صفحه (۰۰۲) دیگر وجود ندارد و این پیک به صورت یک پیک نسبتاً پهن در $2\theta = 24^\circ$ دیده می‌شود. با توجه به مطالب ذکر شده می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب اکسید گرافن در هنگام سنتز نانوذرات اکسید روی کاهش یافته و گروه‌های عاملی آن تا حدود زیادی از بین رفته و به ترکیب گرافن تبدیل شده است. فاصله بین صفحات اکسید گرافن کاهش یافته بر طبق قانون براگ محاسبه شد که $0/371$ نانومتر تعیین گردید که دلالت بر کاهش ترکیب GO و حذف تعداد زیادی از گروه‌های عاملی دارد. از طرف دیگر پیک نسبتاً پهن و ضعیف اکسید گرافن کاهش یافته در $2\theta = 24^\circ$ این حقیقت را آشکار می‌نماید که ترکیب تولید شده دارای میزان بالایی از ورقه ورقه شدن است و تعداد بسیار کمی لایه در ورقه‌های ایجاد شده وجود دارد (۹) و (۱۳).

از طرف دیگر در الگوی پراش اشعه ایکس ترکیب نانوکامپوزیت سنتز شده در شکل ۲ (الف) به خوبی می‌توان الگوی پراش نانوذرات اکسید روی را مشاهده نمود. با مقایسه الگوی پراش اشعه ایکس ترکیب سنتز شده با الگوی پراش استاندارد ZnO که در مراجع مختلف قابل بررسی است (۱۴ و ۱۵) و از جمله الگوی پراش استاندارد (JCPDS Card No. 80-0074) رسم شده در شکل ۲ (الف) (خطوط قرمز رنگ) می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات اکسید روی با ساختار هگزاگونالی و رتزیست سنتز گردیده است. پیک‌های پراش در زوایای $31/9^\circ$ ، $33/9^\circ$ ، 38° ، 48° ، $56/9^\circ$ ، 63° و $69/1^\circ$ مربوط به صفحات بلوری (۱۰۰)، (۰۰۲)، (۱۰۱)، (۱۰۲)، (۱۱۰)، (۱۰۳)، (۱۱۲) و (۲۰۱) نانوذرات اکسید روی است. به کمک معادله دبای-شر اندازه ذرات اکسید روی ۲۲ نانومتر محاسبه گردید.

طیف جذبی - فرابنفش ترکیب اکسید گرافن و نانوکامپوزیت در شکل ۲ (ب) نمایش داده شده است.

در طیف اکسید گرافن یک پیک در طول موج 232 nm مربوط به انتقالات $\pi^* \rightarrow \pi$ پیوندهای $C=C$ آروماتیک و یک شانه

اکسید گرافن $0/713$ نانومتر به دست آمد که در مقایسه با گرافیت ($0/338$ nm) می‌توان نتیجه گرفت که گروه‌های عاملی مبتنی بر اکسیژن بر سطح نانوصفات گرافیت تشکیل شده است و به همین دلیل فاصله بین صفحات افزایش یافته است (۱۰).

طیف FT-IR گرافن اکسید و نانوکامپوزیت در شکل ۱ (ب) نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۱ (ب) ملاحظه می‌شود با انجام فرآیند اکسایش گرافیت پیک‌های ارتعاشی پیوندهای کربن-اکسیژن شامل گروه‌های کربوکسیل، اپوکسی، الکوکسی، کربونیل و هیدروکسیل در اکسید گرافن ظاهر شده است. پیک‌های جذبی در ناحیه 3416 cm^{-1} مربوط به حرکات ارتعاشی کششی گروه O-H، در نواحی 1710 و 1380 cm^{-1} مربوط حرکات ارتعاشی کششی $C=O$ گروه‌های کربوکسیل و کربونیل است. نوار جذبی در ناحیه 1628 cm^{-1} به حرکات ارتعاشی کششی گروه $C=C$ آروماتیک و یا ارتعاشات خمشی گروه هیدروکسیل (O-H) مولکول‌های آب اختصاص دارد. ارتعاشات کششی C-O یا C-O-C اپوکسی و الکوکسی در cm^{-1} 1053 و ارتعاشات کششی C-OH در 1223 cm^{-1} مشاهده می‌گردد. نوار جذبی در ناحیه 1412 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات خمشی C-OH است. پیک مشاهده شده در ناحیه 2363 cm^{-1} مربوط به CO_2 هوا است (۱۰).

با مقایسه طیف دو ترکیب اکسید گرافن و نانوکامپوزیت در شکل ۱ (ب) می‌توان مشاهده نمود که تعدادی از پیک‌های جذبی اصلی ترکیب اکسید گرافن در طیف نانوکامپوزیت سنتز شده مشاهده نمی‌گردد، تعدادی از پیک‌های جذبی شدت آن‌ها کاهش یافته و یا به انرژی‌های بالاتر و یا پایین‌تر انتقال یافته‌اند. پیک‌های جذبی در نواحی 1710 و 1380 cm^{-1} مربوط حرکات ارتعاشی کششی $C=O$ گروه‌های کربوکسیل و کربونیل و نوار جذبی در ناحیه 1412 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات خمشی C-OH کاملاً ناپدید شده است. ارتعاشات کششی C-O یا C-O-C اپوکسی و الکوکسی در 1053 cm^{-1} ، ارتعاشات کششی C-OH در 1223 cm^{-1} و پیک‌های جذبی در ناحیه 3416 cm^{-1} مربوط به حرکات ارتعاشی کششی گروه O-H به شدت کاهش یافته‌اند. با توجه به تغییرات مشاهده شده در طیف نانوکامپوزیت حذف باندهای ارتعاشی گروه‌های اکسیدی می‌توان نتیجه گرفت که با سنتز نانوذرات اکسید روی در نانولایه‌های اکسید گرافن، ترکیب اکسید گرافن کاهش یافته است و به ترکیب گرافن تبدیل شده است (۱۱). حضور باند جذبی در ناحیه 1564 cm^{-1} نشان

آموکسی‌سیلین، تتراسیکلین و حساس به اریترومايسين و سفکسیم بود. GO بر هیچ‌کدام از باکتری‌های مورد مطالعه اثر ضد ممانعت کننده رشد نداشت. در بررسی اثر ضد میکروبی نانوکامپوزیت به روش انتشار از دیسک هر سه باکتری، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه‌های بالینی به این ماده حساس بوده‌اند و در اطراف دیسک به ترتیب هاله عدم رشد باکتری به قطر ۹ mm، ۱۱ mm و ۹ mm مشاهده گردید. حداقل غلظت مهار کننده رشد نانوکامپوزیت برای هر سه باکتری ۴۵ میکروگرم بود. نتایج بررسی اثر ضد میکروبی نانوکامپوزیت در شکل ۴ نشان داده شده است. برای مقایسه قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط برخی دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک به همراه اکسید روی، اکسید گرافن و نانوکامپوزیت در جدول ۱ ارائه شده است. نانوذرات اکسید روی در حضور بستر قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تری نسبت به نانوذرات اکسید روی بدون حضور بستر تشکیل داده‌اند که این نشان می‌دهد نانوذرات اکسید روی در حضور ماتریس خاصیت ضد باکتری بهتری نسبت به نانوذرات ZnO بدون حضور ماتریس دارند. این افزایش خصلت ضد باکتری را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که بستر کربنی نانوذرات اکسید روی را پایدار کرده و باعث می‌شود که رهاسازی یون توسط نانوذرات اکسید روی به محیط کشت به صورت کنترل شده، در مدت‌زمان بیشتر و با سرعت مشخصی آزاد شود و خاصیت ضد باکتری برای مدت‌زمان طولانی‌تری حفظ می‌شود به این ترتیب باکتری نمی‌تواند با گذشت زمان در برابر نمونه مقاومت پیدا کند و در نتیجه خاصیت ضد باکتری افزایش می‌یابد.

Eshed و همکاران پوششی از نانوذره اکسید روی و اکسید مس بر روی دندان درست کردند و نتایج تحقیق آن‌ها حاکی از آن بود که این پوشش ۹۰ تا ۵۰ درصد تشکیل بیوفیلم را کاهش می‌دهد و مکانیسم این پوشش را نفوذ در باکتری و تولید رادیکال اکسیژن داخل سلولی که موجب افزایش پراکسیداسیون چربی و در نتیجه مرگ سلول می‌شود، بیان کردند (۱۹). Akhil و همکاران فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نانوذره اکسید روی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* MTCC3160 و *سودوموناس آئروژینوزا* MTCC1688 را ارزیابی کردند. نتیجه پژوهش آن بود که این نانوذره، فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی خوبی دارد (۲۰). تفاوت MIC در مطالعات مختلف ممکن است به دلیل تفاوت در روش‌های آماده‌سازی نانوذره، اندازه و شکل نانوذره و

طیفی در ۲۹۵-۳۰۵ nm مربوط به انتقالات $\pi \rightarrow \pi^*$ پیوند C=O مشاهده می‌گردد (۱۶). پس از سنتز نانوذرات ZnO بر روی صفحات اکسید گرافن، پیک این ترکیب در طول موج ۲۳۲ nm با انتقال قرمز به سمت طول موج‌های بالاتر منتقل شده و شانه طیفی آن نیز ناپدید گردیده است. این موضوع با تغییر رنگ محلول GO از قهوه‌ای روشن به سیاه هماهنگ است و تأیید می‌کند که با سنتز نانوذرات، اکسید گرافن به گرافن کاهش یافته است (۱۶ و ۱۷).

تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوکامپوزیت در شکل ۲ (ج) ارائه شده است. با توجه به مطالعات صورت گرفته در این خصوص توسط سایر محققین (۱۸)، لایه‌های شفاف و چین‌خورده که در تصویر TEM مشاهده می‌شود مربوط به اکسید گرافن است و نانوذرات اکسید روی با متوسط اندازه ۲۰ نانومتر بر روی این لایه‌ها تشکیل شده‌اند.

نتایج آنالیز عنصری EDX اکسید گرافن در شکل ۳ (الف) ارائه شده است. حضور کربن و اکسیژن در این ترکیب نشان می‌دهد که اکسید گرافن سنتز شده از درصد خلوص بالایی برخوردار است. نتایج آنالیز عنصری EDX نانوکامپوزیت در شکل ۳ (ب) ارائه شده است. حضور کربن، اکسیژن و روی در این ترکیب نشان می‌دهد که ترکیب سنتز شده از درصد خلوص بالایی برخوردار است.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی اکسید گرافن و نانوکامپوزیت در شکل ۳ (ج و د) ارائه شده است. در شکل ۳ (ج) تصویر SEM اکسید گرافن با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰۰ برابر مشاهده می‌گردد که در آن GO به صورت ساختارهای لایه‌ای با لبه نازک وجود دارند. تصویر SEM نانوکامپوزیت در شکل ۳ (د) ارائه شده است. در این تصویر با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰۰ برابر مشاهده می‌گردد که ترکیب اکسید گرافن همچنان ساختار لایه‌ای خود را حفظ کرده و در ضمن نانوذرات اکسید روی بر روی این صفحه‌ها تشکیل شده‌اند.

بررسی اثر ضد میکروبی GO, ZnO و نانوکامپوزیت

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های مورد مطالعه نشان داد که سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، آموکسی‌سیلین و تتراسیکلین و حساس به ونکومايسين، اریترومايسين و سفکسیم بوده، *اشرشیاکلی* مورد مطالعه مقاوم به آموکسی‌سیلین و تتراسیکلین و حساس به اریترومايسين، سفکسیم و سویه *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به

بر روی آن نانوذرات اکسید روی قرار داده شد. بررسی نتایج حاصل از طیفسنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، پراش اشعه ایکس (XRD)، آنالیز عنصری (EDX) و طیفسنجی مرئی - فرابنفش (UV-Vis) تشکیل اکسید گرافن و حضور نانوذرات اکسید روی بر روی اکسید گرافن را تأیید کرد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که اکسید گرافن به صورت ساختارهای لایه‌ای با لبه نازک وجود دارند و نانوذرات اکسید روی بر روی این صفحه‌ها تشکیل شده‌اند. همچنین در تصویر TEM لایه‌های شفاف و چین‌خورده مربوط به اکسید گرافن است و نانوذرات اکسید روی با اندازه متوسط ۲۰ نانومتر بر روی این لایه‌ها تشکیل شده‌اند. نانوکامپوزیت سنتز شده برای فعالیت‌های ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت. در بررسی اثر ضد میکروبی نانوکامپوزیت به روش انتشار از دیسک هر سه باکتری، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه‌های بالینی به این ماده حساس بوده‌اند و در اطراف دیسک هاله عدم رشد باکتری مشاهده گردید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت‌های مالی و معنوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت و ستاد ویژه توسعه فناوری نانو معاونت علمی ریاست جمهوری تشکر و قدردانی می‌گردد. کد پژوهشی مربوط به این مقاله ۱۱۷۳۰۳۰۵۹۴۲۰۱ می‌باشد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

تفاوت در سوش‌های باکتری‌های مورد مطالعه باشد (۲۱). حساسیت باکتری‌ها به نانوذرات فقط به ساختار دیواره سلولی مربوط نمی‌شود، بلکه ممکن است به پراکسیداسیون چربی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن نیز مربوط باشد. با توجه به حاصل ضرب حلالیت اکسید روی ($3/8 \times 10^{-10}$) انتشار یون روی، اختلال در غشا و فرآیندهای غشایی و همچنین با در نظر گرفتن اندازه نانومتري اکسید روی، نانوذرات درونی می‌توانند از دلایل احتمالی آسیب سلولی در باکتری باشد. به هر حال مکانیسم‌های دقیقی که به وسیله آن نانومواد رشد میکروبی را مهار می‌کنند، کاملاً درک نشده است. پژوهش‌های متعدد مکانیسم‌های احتمالی واکنش و فعل‌وانفعال‌های نانومواد با ماکرومولکول‌های بیولوژیکی را این‌طور پیشنهاد می‌کنند که نانومواد یون‌هایی را آزاد می‌کنند که با گروه تیول (-SH) پروتئین‌های موجود بر سطح سلول باکتری‌ها واکنش می‌دهند. این قبیل پروتئین‌ها از غشاء سلولی باکتری به سمت بیرون برآمدگی داشته و موجب انتقال مواد غذایی از دیواره سلول می‌شوند. نانومواد این پروتئین‌ها را غیرفعال کرده، نفوذپذیری غشاء را کاهش داده و سرانجام باعث مرگ سلولی می‌شود (۲۲). نانومواد ممکن است بتوانند چسبندگی میکروبی و تشکیل بیوفیلم را کاهش دهند. نانوذرات اکسید روی باعث تخریب چربی و پروتئین غشای سلولی باکتری می‌شوند و در نتیجه باعث نشت محتویات داخل سلولی و در نهایت مرگ سلول‌های باکتری می‌شوند (۲۳). علاوه بر این، تولید پراکسید هیدروژن و یون Zn^{2+} به عنوان مکانیسم کلیدی اثرات ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی پیشنهاد شده است (۲۰).

نتیجه گیری

در این تحقیق، اکسید گرافن به روش استادنمیر سنتز شده و

References

1. Hu WB, Peng C, Luo WJ, Lv M, Li XM, Li D, et al. Graphene-Based Antibacterial Paper. ACS Nano. 2010; 4(7): 4317-4323.
2. Li Z, Zhang F, Meng A, Xie C, Xing J. ZnO/Ag micro/nanospheres with enhanced photocatalytic and antibacterial properties synthesized by a novel continuous synthesis method. RSC Adv. 2015; 5 (1): 612-620.
3. Musee N, Thwala M, Nota N. The antibacterial effects of engineered nanomaterials: implications for wastewater treatment plants. J Environ Monitor. 2011; 13 (5): 1164-1183.
4. Liu Q, Zhang M, Fang ZX, Rong XH. Effects of ZnO nanoparticles and microwave heating on the sterilization and product quality of vacuum packaged Caixin. J Sci Food Agric. 2014; 94(12): 2547-2554.
5. Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memic A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. Int J Nanomedicine. 2012; 7 (7): 6003-6009.
6. Padmavathy N, Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. Sci. Technol. Adv. Mater. 2008; 9(3): 1-7.
7. Zhang L, Ding Y, Povey M, York D. ZnO nanofluids—A potential antibacterial agent. Prog. Nat. Sci. 2008; 18(8): 939-944.

8. Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, Jimenez de Aberasturi D, Ruiz de Larramendi I, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 2012; 30(10): 499–511.
9. Sarhangzadeh K. Application of multi wall carbon nanotube–graphene hybrid for voltammetric determination of naproxen. *J. Iran. Chem. Soc.* 2015; 12(12): 2133–2140.
10. Li XH, Feng J, Du YP, Bai JT, Fan HM, Zhang HL, et al. One-pot synthesis of CoFe₂O₄/graphene oxide hybrids and their conversion into FeCo/graphene hybrids for lightweight and highly efficient microwave absorber. *J Mater Chem A.* 2015; 3 (10): 5535–5546.
11. Ravichandran K, Chidhambaram N, Gobalakrishnan S. Copper and Graphene activated ZnO nanopowders for enhanced photocatalytic and antibacterial activities. *J. Phys. Chem. Solids.* 2016; 93 (6): 82–90.
12. He P, Wang W, Du L, Dong F, Deng Y, Zhang T. Zeolite A functionalized with copper nanoparticles and graphene oxide for simultaneous electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid. *Anal. Chim. Acta.* 2012; 739 (1): 25–30.
13. Larciprete R, Fabris S, Sun T, Lacovig P, Baraldi A, Lizzit S. Dual path mechanism in the thermal reduction of graphene oxide. *J. Am. Chem. Soc.* 2011; 133(43): 17315–17321.
14. Bera S, Pal M, Naskar A, Jana S. Hierarchically structured ZnO-graphene hollow microspheres towards effective reusable adsorbent for organic pollutant via photodegradation process. *J. Alloys Compd.* 2016; 669 (1):177–186.
15. Men X, Chen H, Chang K, Fang X, Wu CF, Qin W, et al. Three-dimensional free-standing ZnO/graphene composite foam for photocurrent generation and photocatalytic activity. *Appl. Catal. B.* 2016; 187 (1): 367–374.
16. S. Ghasemi, S, Rahman Setayesh, A, Habibi-Yangjeh, M.R, Hormozi-Nezhad, M.R, Gholami. Assembly of CeO₂–TiO₂ nanoparticles prepared in room temperature ionic liquid on graphene nanosheets for photocatalytic degradation of pollutants. *J. Hazard. Mater.* 2012; 199–200 (1): 170–178.
17. Zhou Y, Bao Q, Tang LAL, Zhong Y, Loh KP. Hydrothermal Dehydration for the “Green” Reduction of Exfoliated Graphene Oxide to Graphene and Demonstration of Tunable Optical Limiting Properties. *J. Am. Chem. Soc.* 2009; 21(13): 2950–2956.
18. Tavakoli F, Salavati-Niasari M, badieli A, Mohandes F. Green synthesis and characterization of graphene nanosheets. *Mater. Res. Bull.* 2015; 63 (1): 51–57.
19. Eshed M, Lellouche J, Gedanken A, Banin E. A Zn-doped CuO nanocomposite shows enhanced antibiofilm and antibacterial activities against streptococcus mutans compared to nanosized CuO. *Adv Funct Mater.* 2014; 24(10):1382-90.
20. Akhil K, Jayakumar J, Gayathri G, Khan SS. Effect of various capping agents on photocatalytic, antibacterial and antibiofilm activities of ZnO nanoparticles. *J Photoch Photobio B.* 2016; 160 (1):32- 42.
21. Yousef JM, Danial EN. In vitro antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of zinc oxide and nano-particle zinc oxide against pathogenic strains. *J Health Sci.* 2012; 2(4):38-42.
22. Stoimenov P K, Klinger R L, Marchin G L, Klabunde K J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir* 2002; 18 (17): 6679-6686.
23. Liu Y, He L, Mustapha A, Li H. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7. *J Appl Microbiol* 2009;107: (4) 1193 –1201.



Original Article

Synthesis and Characterization of Graphene - ZnO NPs Nanocomposite and Its Application for Antibacterial Activities

Abdollahi S¹, Pourahmad A^{1*}, Asadpour L²

1. Department of Chemistry, Faculty of Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

2. Department of Microbiology, Faculty of Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Received: 22 Aug 2017

Accepted: 14 Mar 2018

Abstract

Background & Objective: The investigation of the antibacterial activity of nanomaterials has regained importance due to increasing bacterial resistance to antibiotics. Inorganic antibacterial materials have several advantages over traditionally used organic agents; like chemical stability, thermal resistance, safety to the user, long lasting action period, etc. In this research, antibacterial properties of graphene - zinc oxide nanoparticles nanocomposite was evaluated for gram-positive (*S. aureus*) and gram-negative (*E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria.

Material & Methods: The current study demonstrates homogenous decorating of zinc oxide nanoparticles (NPs) onto graphene oxide (GO) surface via simple chemical method.

Disk diffusion method and MIC were used to evaluate the antibacterial activity of ZnO nanoparticles on *S. aureus*, *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* compared to standard commercial antibiotic disks.

Results: XRD results revealed diffraction peaks for each of the two compounds in the nanocomposite. The XRD studies showed that the synthesized ZnO NPs have hexagonal wurtzite structure. It was found that GO addition induces a decrease in crystallite size. Average size of the ZnO NPs was estimated by transmission electron microscopy around 20 nm. ZnO nanoparticles showed bactericidal effects on Gram-positive and Gram-negative bacteria. The improved antibacterial activity of ZnO nanoparticles compared to its microparticles was related to the surface area enhancement in the nanoparticles.

Conclusions: The novel nanocomposite exhibits excellent antibacterial activity against gram-positive (*S. aureus*) and gram-negative (*E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria.

Keywords: Graphene oxide, ZnO nanoparticles, Nanocomposite, Antibacterial activity

*Corresponding Author: Afshin Pourahmad, Department of Chemistry, Faculty of Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Email: pourahmad@iaurasht.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0003-2007-89919>